

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of

Yoshimura, Takashi et. al.

Application No.:

Filing Date: March 24, 2004

Title: Method for Promoting Gonadal Growth in an Animal

Group Art Unit:

Examiner:

Confirmation No.:

**SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: Japan

Patent Application No(s).: 2003-088231

Filed: March 27, 2003

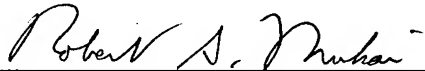
In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

Respectfully submitted,

BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

P.O. Box 1404  
Alexandria, Virginia 22313-1404  
(703) 836-6620

Date: March 24, 2004

By 

Robert G. Mukai

Registration No. 28,531

JAPAN PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : March 27, 2003

Application Number : Japanese Patent Application  
No. 2003-088231

[ST. 10/C] : [JP2003-088231]

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on April 18, 2003

Commissioner,

Japan Patent Office

Shinichiro OTA (Sealed)

Certification No. 2003-3028473

JAPAN PATENT OFFICE

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application : March 27, 2003

Application Number : Japanese Patent Application  
No. 2003-088231

[ST. 10/C] : [JP2003-088231]

Applicant(s) : President of NAGOYA UNIVERSITY

Certified on April 18, 2003

Commissioner,  
Japan Patent Office

Shinichiro OTA (Sealed)

Certification No. 2003-3028473

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2003年 3月27日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2003-088231

[ST.10/C]:

[JP2003-088231]

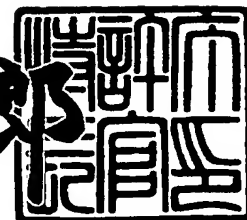
出 願 人  
Applicant(s):

名古屋大学長

2003年 4月18日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3028473

【書類名】 特許願

【整理番号】 U2002P246

【提出日】 平成15年 3月27日

【あて先】 特許庁長官 太田 信一郎 殿

【国際特許分類】 A01K 67/00

【発明の名称】 動物において生殖腺の発達を促進させる方法

【請求項の数】 10

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市天白区天白町平針黒石 2 8 4 5 - 2 5 6  
平針宿舎 E 5 4 2

【氏名】 吉村 崇

【発明者】

【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区向陽町 3 - 1 8 - 1

【氏名】 海老原 史樹文

【特許出願人】

【識別番号】 391012224

【氏名又は名称】 名古屋大学長 松尾 稔

【代理人】

【識別番号】 100072051

【弁理士】

【氏名又は名称】 杉村 興作

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709851

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 動物において生殖腺の発達を促進させる方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 動物に甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体を投与することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法。

【請求項 2】 前記甲状腺ホルモンがトリヨードチロニンである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記動物が鳥類又は哺乳類である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 前記動物が鳥類である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 動物に II 型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子を導入することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法。

【請求項 6】 前記動物が鳥類又は哺乳類である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 前記動物が鳥類である、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】 II 型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子が導入されていることを特徴とする、形質転換動物。

【請求項 9】 前記動物が鳥類又は哺乳類である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 前記動物が鳥類である、請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、動物に甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体を投与することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法に関する。更に本発明は、動物に II 型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子を導入することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法に関する。更に本発明は、II 型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子が導入されていることを特徴とする、形質転換動物に関する。

【0002】

【従来の技術】

鳥類において、可視範囲内の光線の刺激により、視床下部における性腺刺激ホ

ルモン放出ホルモン（GnRH）の分泌及び下垂体による性腺刺激ホルモン（LH）の分泌が制御されることが認められている。光に反応することにより起こることが知られているこのような現象は、光周性（季節性測時機構：photoperiodic time measurement、以下PTMと称する）と呼ばれ、PTMを制御している領域は中枢神経系（視床下部）にあると考えられている。

#### 【 0 0 0 3 】

性腺刺激ホルモンは卵巣や精巣の機能に影響を及ぼすために、家禽などの繁殖は上記のPTMによる制御を受けている。この性質のために、ウズラやニワトリなどの家禽を飼育するにあたって、光線照射を調節することにより採卵を管理することが行われている。例えばニワトリにおいて、日照14～16時間の長日条件下で産卵させ、日照12時間以下の短日条件下で産卵を休止させる、という方法によって採卵の生産性向上が図られている。

#### 【 0 0 0 4 】

更に家禽のみならず、ウマ、ヒツジ、ヤギなどの家畜も光周期によって繁殖が制御され、一定の季節に繁殖することが知られている。具体的には、ウマの場合には日照時間の延長がメスの卵巣機能を活性化するために、主として春に繁殖する。一方、ヒツジの場合には日照時間の短縮がメスの卵巣機能を活性化するために、主として秋に繁殖する。そのために、ウマは長日繁殖動物、ヒツジは短日繁殖動物であるといわれている。

#### 【 0 0 0 5 】

短日繁殖動物のヒツジにおいて、松果体より夜間放出されるホルモンであるメラトニンを投与することによって短日条件と類似した状態を人工的に作り、ヒツジの生産性を制御する方法が産業的に利用されている。しかしメラトニンを用いる方法は一部の短日繁殖動物でのみ有効であり、長日繁殖動物や家禽などの鳥類では無効であるという問題があった。

#### 【 0 0 0 6 】

#### 【発明が解決しようとする課題】

家禽の繁殖制御のための技術としては、上記の光線管理法以外には確立された技術はこれまで知られていなかった。そこで、種々の家禽や家畜において、その



繁殖を制御するための新たな手段が求められていた。よって本発明の課題は、中枢神経系においてPTMを制御するメカニズムを解析することにより、家禽の繁殖制御に利用することができる新たな技術を提供することである。そのような新規な技術が提供されたならば、畜産業のみならず、絶滅の危機にある種の救済などにも役立つものと思われる。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明は、動物に甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体を投与することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法を提供するものである。更に本発明は、動物にII型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子を導入することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法を提供するものである。更に本発明は、II型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子が導入されていることを特徴とする、形質転換動物を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

チロキシシン（以下 $T_4$ と称する）と3,5,3'-トリヨードチロニン（以下 $T_3$ と称する）は甲状腺が分泌する主要ホルモン（甲状腺ホルモン）であり、生体における熱産生作用に関与している。 $T_3$ は甲状腺から分泌されるのみならず、脱ヨウ素酵素によって末梢においても作られる。また $T_3$ と類似する分子として、 $T_3$ （3,5,3'-トリヨードチロニン）とヨウ素の結合位置が異なるリバーストリヨードチロニン（3,5,5'-トリヨードチロニン、以下 $RT_3$ と称する）の存在も知られている。ホルモンとしての活性は $T_4$ より $T_3$ の方が強く、 $RT_3$ は非活性である。 $T_4$ と $T_3$ 構造を以下の図1に示す。

【0009】

上記の脱ヨウ素酵素は甲状腺の他、肝臓、腎臓、筋肉、下垂体などの広い範囲に分布している酵素であって、 $T_4$ の脱ヨウ素反応を触媒して $T_3$ を生成することが知られている。 $T_4$ の脱ヨウ素反応には5'-脱ヨウ素酵素と5-脱ヨウ素酵素が関与しており、それぞれ $T_3$ の生成と $RT_3$ の生成を触媒している。そして、生成した $T_3$

と $RT_3$ は、種々のジヨードチロニンに転換される。脱ヨウ素酵素による $T_4$ の代謝の様式を図2に示す。

#### 【0010】

5'-脱ヨウ素酵素には、I型脱ヨウ素酵素、II型脱ヨウ素酵素、III型脱ヨウ素酵素の3種類が存在することが知られている。I型脱ヨウ素酵素は肝臓と腎臓のミクロソームに含まれる酵素であって、 $T_4$ の外環の脱ヨウ素化による $T_3$ への変換と、 $RT_3$ から3,3'-ジヨードチロニンへの変換を触媒する。II型脱ヨウ素酵素はI型脱ヨウ素酵素と同様の作用を有し、脳、下垂体と褐色脂肪に含まれている。またIII型脱ヨウ素酵素は内環にのみ作用し、胎盤と脳に含まれている。

#### 【0011】

本発明者らは下記の実施例において示す様に、光周期が鳥類の生殖を制御する分子機構を検討した。具体的には、ディファレンシャル・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションの手法を用いて、ニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) において光刺激により発現が誘導される遺伝子の解析を行なった。その結果、視床下部内側基底部 (medial basal hypothalamus:MBH) において、II型脱ヨウ素酵素 (以下D2と称する) の遺伝子の発現が、光によって誘導されることを見出した。よって、光によって誘導されたD2の発現はPTMの制御に関与しているものと思われる。

#### 【0012】

上記で詳細に述べたように、II型脱ヨウ素酵素は末梢において、 $T_4$ の脱ヨウ素反応を触媒し $T_3$ を生成する反応を触媒する。そこで、D2の酵素生成物がPTMの制御を介して鳥類の生殖に関与している可能性を考えて、 $T_3$ をニホンウズラの脳室内に投与した結果、精巢の増大が認められた。この知見は、中枢神経系に存在するD2によって $T_4$ から $T_3$ への変換が起こり、生成した $T_3$ が生殖腺の発達を促進していることを示すものである。よって本発明は鳥類におけるPTMの分子機構の解明を通じて、甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体を投与することからなる、動物の性腺の発達を促進させるための新たな方法を提供するものである。

#### 【0013】

なお、本願明細書において「甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体」には主要な甲状腺ホルモンである $T_3$ と $T_4$ 、更には $T_3$ と同様の活性を有する類縁体が含まれる。そのような類縁体の具体例としては、例えばTETRAC (3,5,3',5'-Tetraiodothyroacetic acid) を挙げることができるが、それに限定されるものではなく、 $T_3$ と同様の活性を有する他の化合物もまた含まれるものである。

## 【0014】

投与方法という点で本発明において最も好ましい態様は、中枢神経系への $T_3$ の直接投与、特に脳室内へ直接投与である。 $T_4$ は活性が低いために、 $T_4$ を中枢神経系へ投与した場合には効果が得られないか、又は得られても効果はかなり弱いと考えられる。しかし $T_4$ を静脈投与、経口投与などの方法によって末梢から投与すると、投与された $T_4$ の大部分は血液中で代謝されて $T_3$ になる。よって $T_4$ を末梢から投与した場合には、血液中で産生された $T_3$ が中枢神経系で作用すると考えられ、 $T_4$ の末梢投与も本発明における好ましい態様の一つである。

## 【0015】

なお、 $T_3$ を末梢から投与すると、投与された $T_3$ は血液中で代謝されて3,3'-ジヨードチロニン (3,3'- $T_2$ ) 等に変換されて、不活性となると考えられる。それを考えると、末梢から投与する場合には $T_3$ を投与するよりも、その前駆体である $T_4$ を投与の方が好ましいと思われる。 $T_3$ を末梢投与する場合には、例えば剤型を工夫するなどして、 $T_3$ が血液中で代謝を受けること防ぐ必要がある。上記の教示に鑑みて、甲状腺ホルモン又はそれと同様の活性を有する類縁体を本発明の目的で投与するにあたり、脳室内投与のみならず、経口投与、静脈投与、動脈投与、腹腔内投与、経皮投与や経粘膜投与などの種々の投与経路を選択することが可能である。

## 【0016】

下記の実施例において、ニホンウズラに一日あたり0.3ngの $T_3$ を脳室内投与した際に最大の効果を得ている。本発明において投与する $T_3$ の量は一日あたり、1pgから10 $\mu$ g、好ましくは10pgから1 $\mu$ g、更に好ましくは0.1ngから100ngである。しかし、本発明において投与する $T_3$ の用量は、上記の範囲内に限定されるもので

はなく、投与する化合物、投与する対照である動物の種類や大きさ、更には投与の経路により、最も適切な用量を選択して投与を行うことにより、目的とする効果を得ることができる。

【0017】

また、D2をコードする遺伝子を動物に導入して過剰発現させることにより、該動物においてD2の発現量を増やすことが可能である。遺伝子を導入された動物の体内において、特に中枢神経系においてD2が過剰発現すると、酵素反応の生成物である $T_3$ のレベルが増加する。よってD2遺伝子が脳内で恒常的に発現した形質転換動物を作製することにより、該動物において性腺の発達を促進させることができる。

【0018】

本発明において形質転換を行う対象となる動物種は特に限定されるものではなく、鳥類や哺乳類を含む種々の動物においてD2をコードする遺伝子を導入することにより、その性腺の発達を促進させることができる。中でも、ウズラ、ニワトリ、シチメンチョウなどの家禽を用いることは本発明の態様として特に好適である。なお、鳥類における形質転換体の作製は、例えば、A.J.Harvey et al., "Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens" *Nature biotechnology*, 2002, (19), 396-399において報告されている。

【0019】

更に、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギなどの哺乳類に属する家畜においても、本発明の方法を適用することができると思われる。これらの家畜あるいは上記の家禽にD2をコードする遺伝子を導入することにより、高い繁殖力を有する形質転換動物を作製することが可能である。よって本発明の方法は畜産業の発達に大いに資するものと思われる。

【0020】

$T_3$ を投与する動物の性別は、オス又はメスのいずれかに限定されるものではない。下記の実施例において、 $T_3$ を投与することによりオスの精巣が発達したことが示されている。生殖腺の発達の機構はオスとメスにおいて共通しており、視床下部から放出される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) によって制御されて

いることが知られている。オスとメスはその性差に関わらず、脳内において同様の分子メカニズムによって日長を計っているものと考えられるために、 $T_3$ を投与することによってオスの精巣を発達させることができるのみならず、メスにおいて卵巣を発達させることもできると考えられる。

以下実施例により本発明を具体的かつ詳細に説明する。しかし本発明の範囲は下記の実施例によって限定されるものではない。

#### 【 0 0 2 1 】

##### 【実施例】

(PTMを担っている遺伝子の分析)

鳥類においてPTMを担っている遺伝子を解析するために、ディファレンシャル・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション解析を試験した。40羽のニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) を8週齢になるまで短日条件下で飼育した。なお、短日条件とは明状態が8時間で暗状態が16時間の条件であり、長日条件とは明状態が16時間で暗状態が8時間の条件をいう。20羽の動物をツァイトゲバー時間 (zeitgeber time : ZT) 14で1時間光パルスに曝した。一方他の20羽の動物を暗がりの中で飼育した。

#### 【 0 0 2 2 】

光パルス (ZT16) の1時間後、急性の遺伝子発現の変化を避けるために両群の動物を断頭して屠殺し、3mmの脳スライスから視床下部内側基底部 (MBH) を採取した。図3に、ディファレンシャル・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーションにより、遺伝子を採取するのに用いた脳の領域を示す。図3において、MBHは視床下部内側基底部、MEは正中隆起、OCは視交叉、POAは視索前野、SCNは視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus)、Pは松果体、Cbは小脳を示す。

#### 【 0 0 2 3 】

全RNAを抽出し、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAを精製した。製造元の指示書にしたがってディファレンシャル・サブトラクティブ・ハイブリダイゼーション解析を行った (PCRセレクトcDNAサブトラクションキット、クロンテック)。150クローンの配列解析を行い、それらの遺伝子の発現を、インサイチュハイブリダイゼーションを用いて実証した。

## 【0024】

図4 aは視床下部後内側核 (nucleus hypothalamicus posterior medialis: NHPM) において、光により誘導されたD2の発現を示す写真である。なお、矢印は発現しているD2を示す。尚、図4 bは光パルスを与えていないコントロール動物の写真である。ZT14において光パルスを1時間与えて、光パルスの1時間後に脳のサンプルを採取した。また図5 aは、NHPMにおける各相でのD2発現を示したグラフである。ZT14は光誘導相内であって、ZT9, ZT21は光誘導層外である。アスタリスクマークは、 $P<0.01$ における有意差を示す。

## 【0025】

その結果、NHPMにおいて、光パルスによるD2の遺伝子の誘導が光誘導相 (ZT14) において認められた (図4 a, b)。光誘導相外 (ZT9, ZT21) における光照射の影響を検討したところ、光誘導されたD2の発現は、ZT9とZT21では観察されなかった。この結果は、D2の光誘導は光誘導相に特異的である (図5 a) ことを示唆している。

## 【0026】

短日下と長日下におけるD2遺伝子の発現プロファイルを解析するために、更にインサイチュハイブリダイゼーションの検討を行った。図5 bに、長日下 (LD) と短日下 (SD) における、時間によるD2遺伝子の発現プロファイルを示す。両群による差は認められず、短日下と長日下の両条件において、どの時間でもD2の発現を検出することはできなかった。

## 【0027】

また、短日と長日の条件下で飼育した動物において、腹側の漏斗核 (infundibular nucleus: IN) と正中隆起 (median eminence: ME) におけるD2の発現を示した写真を図6に示す。図6 aは、INとMEにおいて長日刺激により誘導されたD2の発現を示す写真であり、図6 bは短日条件で飼育したコントロール動物の写真である。その結果、D2の発現はINとMEにおいても観察された (図6 a, b)。そこでD2の発現に対する光パルスの効果 (図7 a) と時間によるプロファイル (図7 b) についても検討を行った。その結果、INとMEにおいて、短日での弱い発現と、長日での強い発現が観察された。

## 【 0 0 2 8 】

上記の結果より、D2の発現は光により誘導されることが見出されたが、発現のプロファイルは脳の領域により異なっていた。NHPMにおいては急性の誘導が観察されたが、継続的な長日の光周期ではその発現は観察されなかった。対照的に、腹側のINとMEにおける発現は長日条件の光周期で増加したが、急性の誘導は観察されなかった。

## 【 0 0 2 9 】

(甲状腺ホルモンの含量と標的部位)

D2はチロキシン ( $T_4$ ) を3,5,3' -トリヨードチロニン ( $T_3$ ) に変換する酵素であり、主としてチロイドホルモンの作用を担っている。いろいろな状況下で $T_3$ 濃度を狭い範囲に保つことにより、D2は脳 $T_3$ の局所的な制御において本質的な役割を果たしている。本発明者らは、短い日長と長い日長の下で採取した視床下部内側基底部 (MBH: 各群について10匹の動物のMBHをプールした) における、 $T_3$ と $T_4$ の含量を試験した。

## 【 0 0 3 0 】

短日群と長日群における血漿中の $T_3$ と $T_4$ の含量を示す (図 8 a)。また、MBH、SGC(stratum griseum centrale: 中心灰白層)、Cb (cerebellum: 小脳) における $T_3$  (図 8 b) と $T_4$  (図 8 c) の含量の検討を行った。その結果、血漿における $T_3$ と $T_4$ の含量は短日群と長日群で異なっていなかったが (図 8 a)、MBHにおける $T_3$ と $T_4$ 含量は、長い日長の動物では短い日長の動物と比較して約10倍高かった (図 8 b, c)。しかし、SGCやCbなど他の部位ではこの差は観察されなかった (図 8 b, c)。

## 【 0 0 3 1 】

図 8 により、長日群の動物において、MBHの $T_3$ 含量はD2によって増加することが確認された。しかし、その様な差は血清や脳の他の部位においては観察されなかった。D2は細胞内におけるプロホルモン $T_4$ から活性型である $T_3$ への脱ヨード化を触媒し、それはD2が甲状腺ホルモン作用において門番の様に作用し、局所における $T_3$ の利用性を調節していることを示唆している。加えて長日動物のMBHにおいて $T_4$ 含量も増加していた。長日条件下において、 $T_4$ の取り込みが増加す

ることにより、D2はこの領域でより多くの $T_3$ を生成するようになる。

#### 【0032】

局所的に生じた $T_3$ が作用する標的部位を解明するために、チロイドホルモンレセプター (TR) 遺伝子 ( $TR\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\beta 2$ 、 $RXR\alpha$ 、 $\gamma$ ) の発現を検討した。INとMEにおける、 $TR\alpha$  遺伝子 (図9 a)、 $TR\beta$  遺伝子 (図9 b)、 $RXR\alpha$  遺伝子 (図9 c) の発現を図9に示す。その結果、INとMEにおいて、 $TR\alpha$ 、 $\beta$  遺伝子の弱い発現と、 $RXR\alpha$  遺伝子の強い発現が観察された (図9 a、b、c)。一方、 $TR\beta 2$ と $RXR\gamma$  の発現は検出不可能であった。 $TR\alpha$ 、 $\beta$  と $RXR\alpha$  の発現は、短い日長でも長い日長でも一日中観察され、律動的な発現は示さなかった。これらの結果は、局所的に生成した $T_3$ がINとMEで作用することを示している。

#### 【0033】

( $T_3$ の投与による性腺の発達)

$T_3$ が性腺の光周反応を仲介しているかについて評価を行うために、 $T_3$ の脳室内注入が性腺の発達に及ぼす影響を検討した。ベヒクル及びいくつかの用量の $T_3$ と $T_4$ を浸透圧ポンプによって第三脳室に注入し、注入前後の精巣の大きさを測定した。 $T_3$  (●) と $T_4$  (○) の投与による精巣の発達を図10 aに示す。動物を短日条件下 (明条件8時間、暗条件16時間) に置いた時でさえも、 $T_3$ を注入すると用量依存的に性腺が成長した ( $p=0.0128$ , 一元配置分散分析法,  $F(5,18)=4.008$ )。一方 $T_4$ を注入することによる影響は小さかった ( $p=0.8111$ , 一元配置分散分析法,  $F(3,16)=0.32$ )。しかし最大用量の $T_3$ では精巣の発達が観察されなかった。イオパン酸 (IOP) は $T_4$ から $T_3$ への変換を阻害すると知られている。そこで更に、長日条件下においてIOPを注入する効果を検討した (図10 b)。図10 bに見られるように、長日条件下でIOPは精巣の発達を抑制した ( $p<0.05$ )。

#### 【0034】

Follettらは、薬剤用量のチロイドホルモン ( $T_4$ と $T_3$ ) を末梢投与すると、光周期によって誘導されたゴナドトロピンの分泌と性腺の発達を模倣することを示した (Follett B.K. et al., "Acute effect of thyroid hormones in mimicking photoperiodically induced release of gonadotropins in Japanese quail" J.Comp.Physiol. B 157, 837-843 (1988)、及びFollett B.K.et al., "Thyroxine



can mimic photoperiodically induced gonadal growth in Japanese quail" J .Comp.Physiol. B 157, 829-835 (1988)、を参照)。しかし上記の結果では、ゴナドトロピン遊離においては、 $T_3$ よりも $T_4$ の効果の方が高く、Follettらの報告の結果と矛盾しているように思われる。

#### 【 0 0 3 5 】

しかし血液中において、 $T_4$ の約1/3が $T_3$ に、45%がリバーサス $T_3$  ( $RT_3$ ) に変換されることが知られている。更に、血中において $T_3$ は3,3' -ジヨードチロニン (3,3' - $T_2$ ) に変換される。そこで、末梢から投与した $T_4$ は、中枢神経系において $T_3$ となった作用しているものと思われる。更に長日の条件下において、D2阻害剤であるIOPは精巣の発達を抑制した。この結果は、PTMの制御においてD2が重要であることを明確に示すものである。

#### 【 0 0 3 6 】

##### 【発明の効果】

本発明により、動物に甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体を投与することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法が与えられた。更に本発明により、動物にII型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子を導入することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法と、II型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子が導入されていることを特徴とする、形質転換動物が与えられた。本発明の方法は、鳥類における光周性（季節性測時機構）の分子機構の解明を通じて、動物の性腺の発達を促進させるための新たな方法を提供するものである。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

図 1 は、 $T_4$ と $T_3$ の構造を示す図である。

##### 【図 2】

図 2 は、脱ヨウ素酵素による $T_4$ の代謝の様式を示す図である。

##### 【図 3】

図 3 は、遺伝子を採取するのに用いた脳の領域を示す図である。

##### 【図 4】

図 4 は、光により誘導された D2 遺伝子の発現を NHPM（視床下部後内側核）において検出した写真である。

【図 5】

図 5 は、D2 の発現に対する光パルスの効果と日長の長さの効果を NHPM において検出したグラフである。

【図 6】

図 6 は、長日刺激により誘導された D2 遺伝子の発現を IN と ME において検出した写真である。

【図 7】

図 7 は、D2 の発現に対する光パルスの効果と日長の長さの効果を IN と ME において検出したグラフである。

【図 8】

図 8 は、短日群と長日群における血漿中の  $T_3$  と  $T_4$  の含量（図 8 a）と、MBH、S GC (stratum griseum centrale: 中心灰白層)、Cb (cerebellum: 小脳) における  $T_3$ （図 8 b）と  $T_4$ （図 8 c）の含量を示すグラフである。

【図 9】

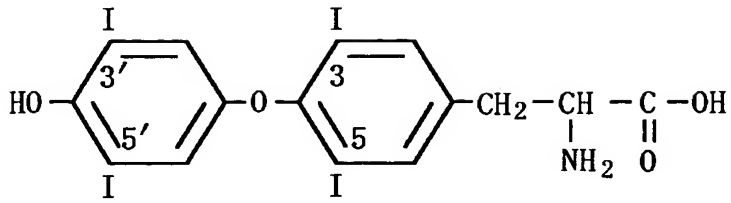
図 9 は、IN と ME における、チロイドホルモンレセプター遺伝子 ( $TR\alpha$ 、 $\beta$ 、 $RX R\alpha$ ) の発現を示す写真である。

【図 10】

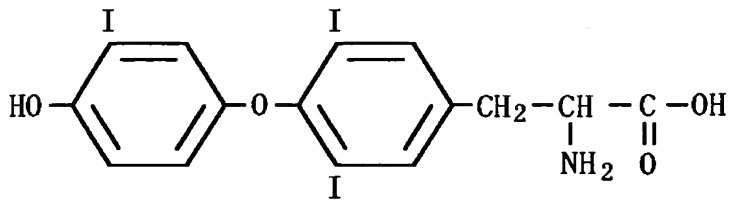
図 10 は、 $T_3$  と  $T_4$  の投与による精巣の発達と、精巣の発達に IOP が及ぼす効果を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】

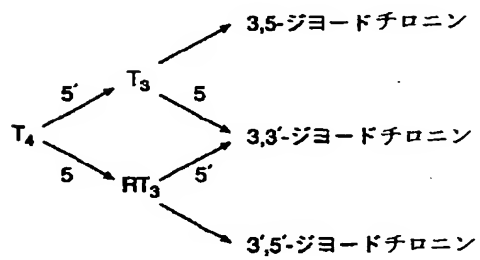


3, 5, 3', 5' - テトラヨードチロニン (チロキシン,  $T_4$ )

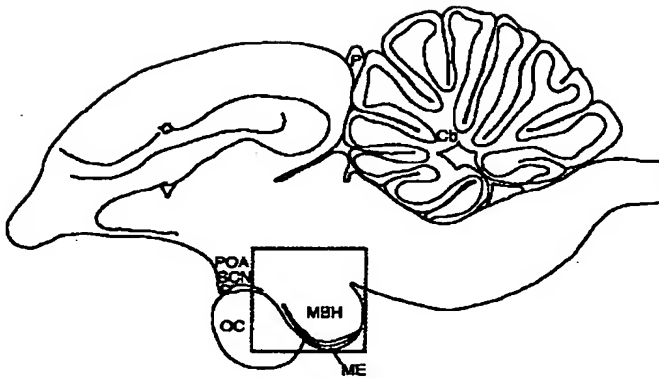


3, 5, 3' - トリヨードチロニン ( $T_3$ )

【図 2】



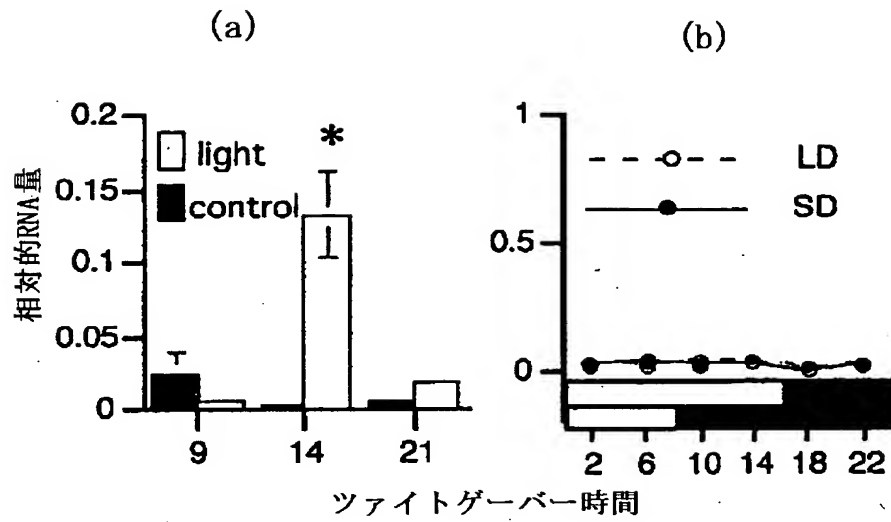
【図3】



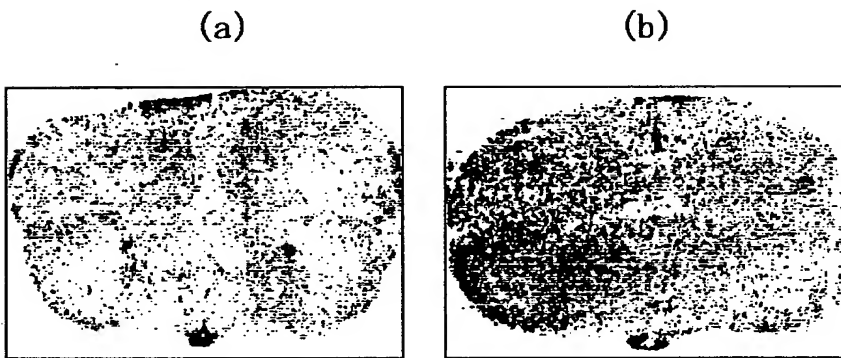
【図4】



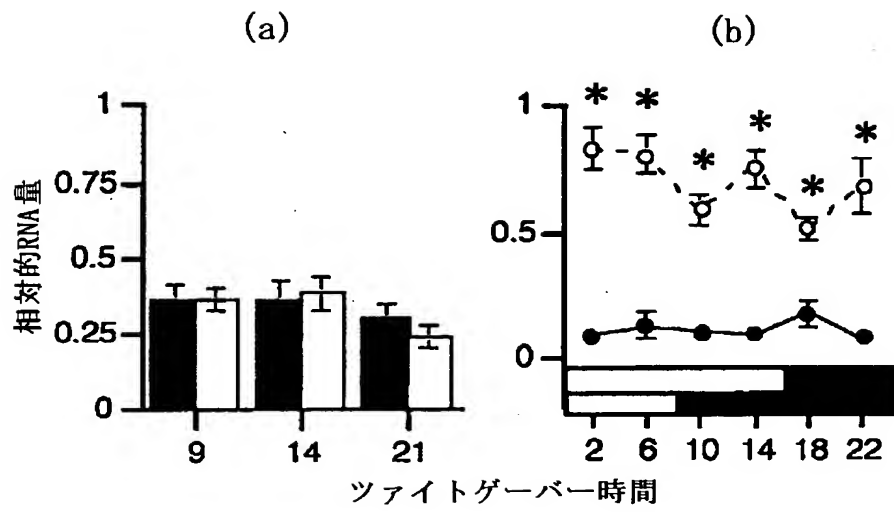
【図5】



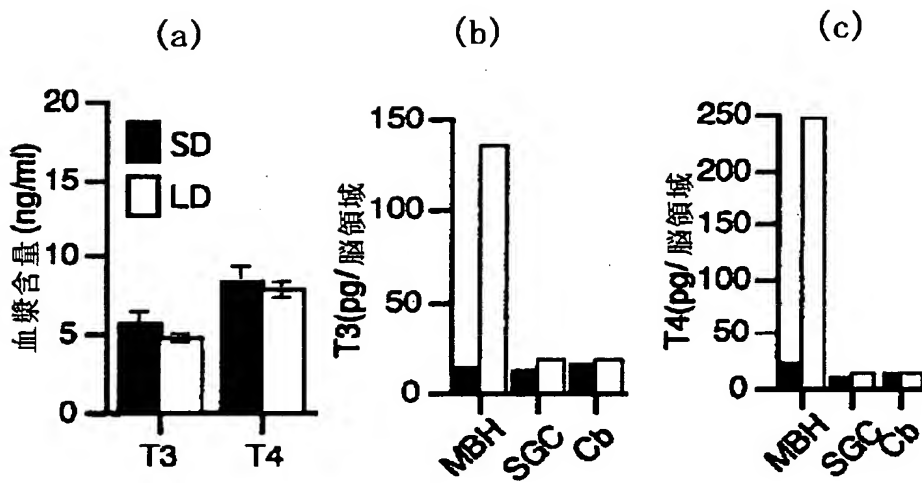
【図6】



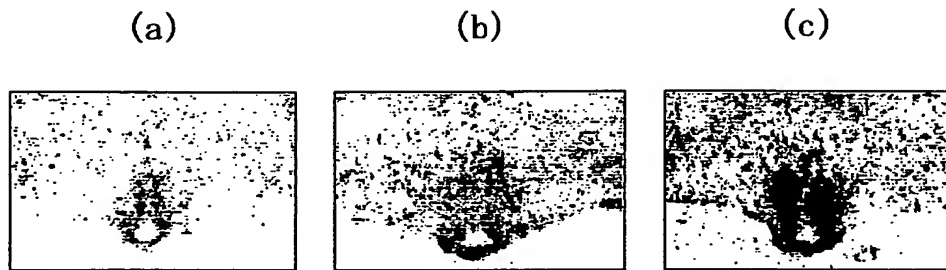
【図 7】



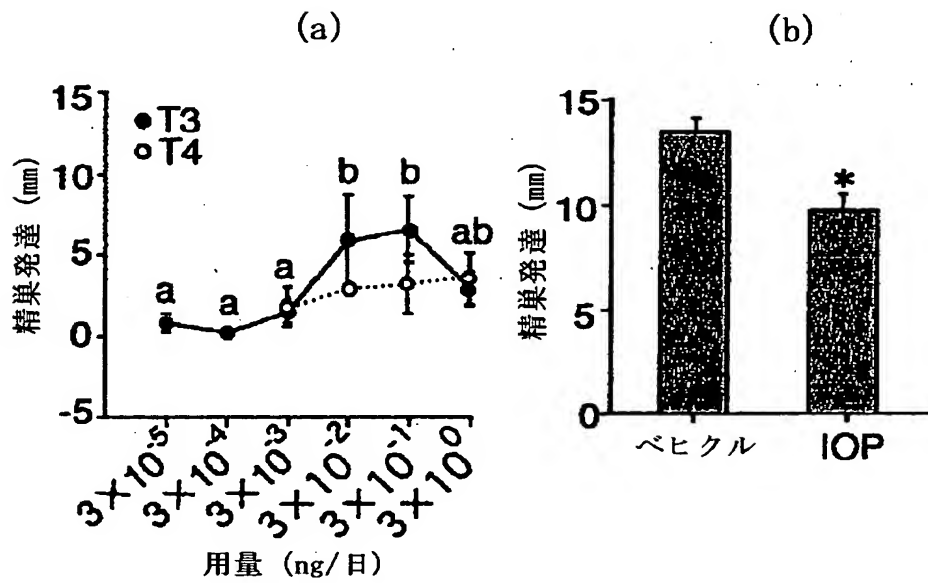
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 家禽や家畜の繁殖制御に利用できる新たな技術を提供することが、本発明の課題である。

【解決手段】 本発明により、動物に甲状腺ホルモン又は甲状腺ホルモン様の活性を有する類縁体を投与することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法が与えられた。更に本発明により、動物にII型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子を導入することを特徴とする、動物において生殖腺の発達を促進させる方法と、II型脱ヨウ素酵素をコードする遺伝子が導入されていることを特徴とする、形質転換動物が与えられた。本発明の方法は、鳥類における光周性（季節性測時機構）の分子機構の解明を通じて、動物の性腺の発達を促進させるための新たな方法を提供するものである。

【選択図】 なし



認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-088231
受付番号	50300506434
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0091
作成日	平成15年 3月28日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】	391012224
【住所又は居所】	愛知県名古屋市千種区不老町（番地なし）
【氏名又は名称】	名古屋大学長

【代理人】

【識別番号】	100072051
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関3-2-4 霞山ビル7階
【氏名又は名称】	杉村 興作

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [391012224]

1. 変更年月日 1991年 1月22日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市千種区不老町 (番地なし)

氏 名 名古屋大学長